

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 H1-106PCT1	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/04516	国際出願日 (日.月.年) 06.07.00	優先日 (日.月.年) 08.07.99	
出願人(氏名又は名称) 株式会社ヘリックス研究所			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/10, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15, C12P 21/02, C07K 16/18, C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/10, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15, C12P 21/02, C07K 16/18, C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), REGISTRY (STN), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 98/52963, A1 (UNIV JEFFERSON THOMAS) 26. 11月. 1998 (26. 11. 98) & AU, 9876880, A & EP, 983293, A1 & US, 6037461, A & US, 6063760, A	1-19
P, A	WO, 99/64584, A2 (DEUT KREBSFORSCHUNGSZENTRUM) 09. 12月. 1999 (09. 12. 99) & DE, 19825621, A1 & AU, 9952781, A	1-19
A	STEGH, A. H. et al. "DEDD, a novel death effector domain- containing protein, targeted to the nucleolus", EMBO J. (1998) Vol. 17, No. 20, p. 5974-5986	1-19

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 09. 00

国際調査報告の発送日

10.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J'P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B

9 2 8 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

REC'D 02 MAR 2001

WIPO

PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 H1-106PCT1	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ I-PEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/04516	国際出願日 (日.月.年) 06.07.00	優先日 (日.月.年) 08.07.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl ¹ C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/10, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15, C12P 21/02, C07K 16/18, C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577		
出願人(氏名又は名称) 株式会社ヘリックス研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - II ☐ 優先権
 - III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - IV ☐ 発明の単一性の欠如
 - V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - VI ☐ ある種の引用文献
 - VII ☐ 国際出願の不備
 - VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 25.01.01	国際予備審査報告を作成した日 14.02.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 高堀 栄二	4B 9281
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | | |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | | |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | | |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-19

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-19

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-19

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: WO, 98/52963, A1 (UNIV JEFFERSON THOMAS) 26.11月.1998(26.11.98)

文献2: STEGH, A. H. et al., EMBO J. (1998) Vol. 17, No. 20, p. 5974-5986

請求の範囲1-19に記載された発明は、国際調査報告に記載された何れの文献にも開示されておらず、新規性及び進歩性を有する。文献1-2には、本願の配列番号2又は4のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチドは記載されておらず、当業者といえども容易に想到し得ないものである。

P, ENT COOPERATION TREAT

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Building 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 14 January 2002 (14.01.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference H1-106PCT1	
International application No. PCT/JP00/04516	
International publication date (day/month/year) 18 January 2001 (18.01.01)	
Applicant HELIX RESEARCH INSTITUTE et al	International filing date (day/month/year) 06 July 2000 (06.07.00) Priority date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
08 July 1999 (08.07.99)	11/194179	JP	25 Augu 2000 (25.08.00)
18 Octo 1999 (18.10.99)	60/159,586	US	20 Octo 2000 (20.10.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Shinji IGARASHI

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338.83.38

004588123

Copy for the Elected Office (EO/US)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP00/04516

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Building 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 21 January 2002 (21.01.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference H1-106PCT1	
International application No. PCT/JP00/04516	
International filing date (day/month/year) 06 July 2000 (06.07.00)	

1. The following indications appeared on record concerning:
- ☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality
State of Residence
Telephone No.
Facsimile No.
Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:
- ☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
4-7, Doshomachi 3-chome
Chuo-ku
Osaka-shi
Osaka 541-8514
Japan

State of Nationality
JP
State of Residence
JP
Telephone No.
Facsimile No.
Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:
The applicant identified in Box 2 should be included on the record as an additional applicant for all designated States except US.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the International Preliminary Examining Authority

☐ the designated Offices concerned
☒ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Susumu KUBO

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

004605794

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 02 March 2001 (02.03.01)	
International application No. PCT/JP00/04516	Applicant's or agent's file reference H1-106PCT1
International filing date (day/month/year) 06 July 2000 (06.07.00)	Priority date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)
Applicant OTA, Toshio et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

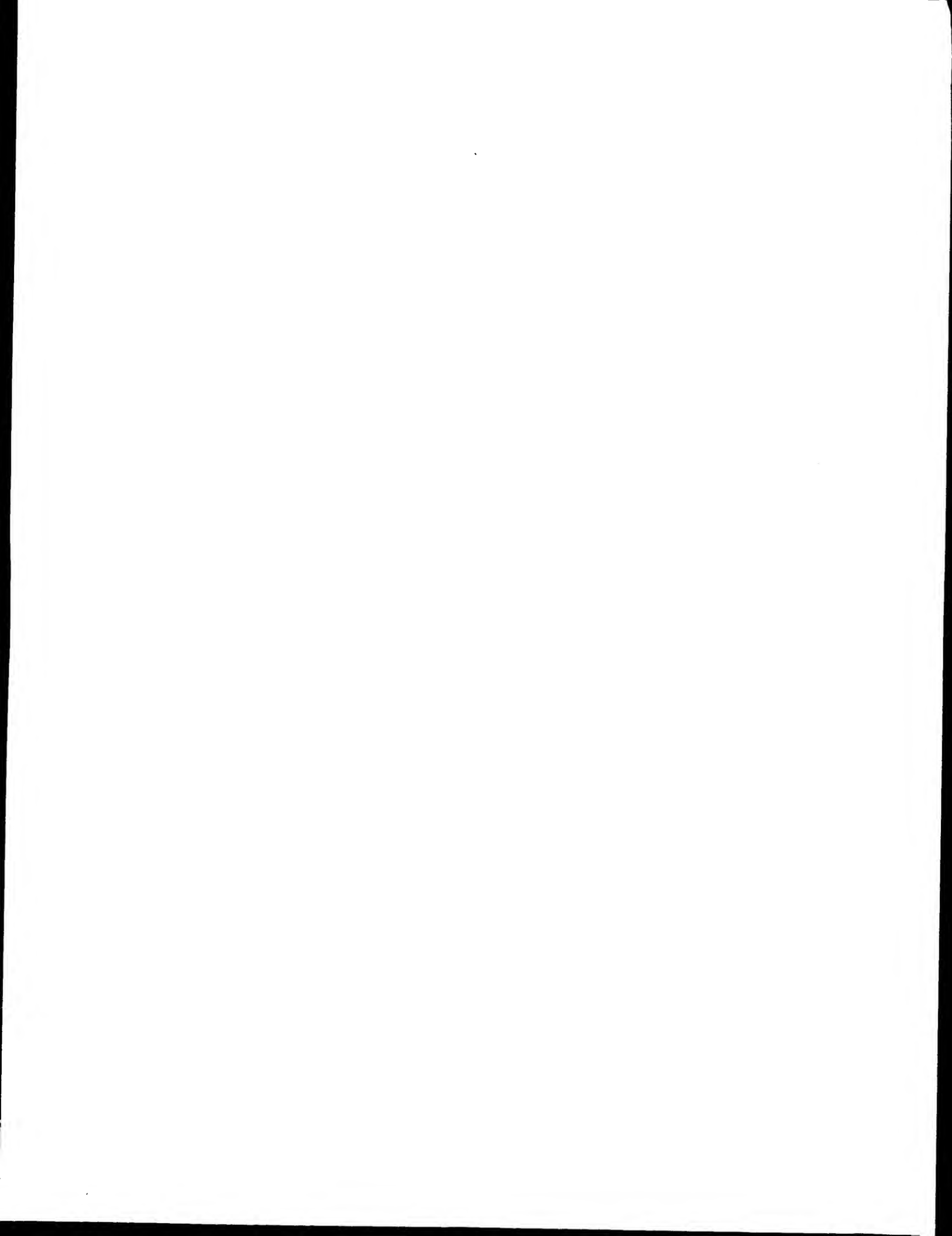
☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
25 January 2001 (25.01.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

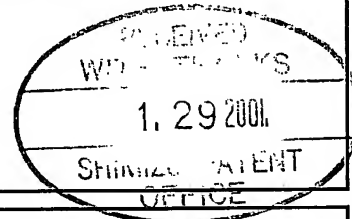


PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:
SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Building 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 18 January 2001 (18.01.01)		
Applicant's or agent's file reference H1-106PCT1		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/04516	International filing date (day/month/year) 06 July 2000 (06.07.00)	
		Priority date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)
Applicant HELIX RESEARCH INSTITUTE et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AG,AU,BZ,DZ,KR,MZ,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,
GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,
NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).
3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
18 January 2001 (18.01.01) under No. WO 01/04300

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/10, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15,
C12P 21/02, C07K 16/18,
C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/10, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15,
C12P 21/02, C07K 16/18,
C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),
REGISTRY (STN), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 98/52963, A1 (UNIV JEFFERSON THOMAS), 26 November, 1998 (26.11.98) & AU, 9876880, A & EP, 983293, A1 & US, 6037461, A & US, 6063760, A	1-19
P, A	WO, 99/64584, A2 (DEUT KREBSFORSCHUNGSZENTRUM), 09 December, 1999 (09.12.99) & DE, 19825621, A1 & AU, 9952781, A	1-19
A	STEGH, A. H. et al., "DEDD, a novel death effector domain- containing protein, targeted to the nucleolus", EMBO J. (1998) Vol.17, No.20, p.5974-5986	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 September, 2000 (27.09.00)

Date of mailing of the international search report
10 October, 2000 (10.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

11T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference H1-106PCT1	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04516	International filing date (day/month/year) 06 July 2000 (06.07.00)	Priority date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/10, 1/21, 1/19, 1/15, C12P 21/02, C07K 16/18, C12P 21/08, G01N 33/53, 33/577		
Applicant HELIX RESEARCH INSTITUTE		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 25 January 2001 (25.01.01)	Date of completion of this report 14 February 2001 (14.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04516

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04516

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: WO, 98-52963, A1 (Univ. Jefferson Thomas), 26 November, 1998 (26.11.98)

Document 2: Stegh, A.H. et al., EMBO J. (1998), Vol. 17, No. 20, pages 5974-5986

The subject matters of claims 1-19 appear to be novel and to involve an inventive step since they are not disclosed in any of the documents cited in the ISR. Documents 1 and 2 do not describe a polynucleotide encoding a protein consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4 of the present application, and a person skilled in the art could not have easily conceived of this constituent feature.

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年1 月18 日 (18.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/04300 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, C07K
14/47, C12N 5/10, 1/21, 1/19, 1/15, C12P 21/02, C07K
16/18, C12P 21/08, G01N 33/53, 33/577

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04516

(22) 国際出願日: 2000 年7 月6 日 (06.07.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/194179 1999 年7 月8 日 (08.07.1999) JP
60/159,586 1999 年10 月18 日 (18.10.1999) US

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE)
[JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3
Chiba (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 太田紀夫 (OTA,
Toshio) [JP/JP]; 〒251-0042 神奈川県藤沢市辻堂新町
1-2-7-105 Kanagawa (JP). 磯貝隆夫 (ISOGAI, Takao)
[JP/JP]; 〒300-0303 茨城県稲敷郡阿見町大室511-12
Ibaraki (JP). 西川哲夫 (NISHIKAWA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒
173-0013 東京都板橋区氷川町27-3-403 Tokyo (JP). 河
合弓利 (KAWAI, Yuri) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更
津市矢那4508-19-201 Chiba (JP). 三好荘介 (MIYOSHI,

Sousuke) [JP/JP]; 〒305-0031 茨城県つくば市吾妻
1-4-3-602-208 Ibaraki (JP). 佐藤 晋 (SATO, Susumu)
[JP/JP]; 〒300-2436 茨城県筑波郡谷和原村絹の台
6-19-11 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階
Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: APOPTOSIS-ASSOCIATED FACTOR

(54) 発明の名称: アポトーシス関連因子

(57) Abstract: A novel apoptosis-associated factor which is a novel protein having DED, caspase family-cleavage domain, etc. This protein induces apoptosis in cells. Thus, a compound which is useful in regulating apoptosis can be screened by using this protein as a target. Moreover, the protein per se is useful in regulating diseases with cell proliferation.

(57) 要約:

新規なアポトーシス関連因子が提供される。本発明のアポトーシス関連因子は、DED や caspase ファミリー切断ドメイン等を備えた新規な蛋白質である。この蛋白質は、細胞にアポトーシスを誘導する。したがってこの蛋白質を標的として、アポトーシスの制御に有用な化合物のスクリーニングを行うことができる。また、この蛋白質自身は、細胞増殖性疾患の制御に有用である。

WO 01/04300 A1

明細書

アポトーシス関連因子

技術分野

本発明は、アポトーシス関連因子に関する。

背景技術

アポトーシスは、かつてプログラムされた細胞死と言われていた。多細胞生物の生存においては、望ましくない、あるいは必要の無い細胞を生体から排除する機構が必要である。アポトーシスは、発生過程や細胞の世代交代において、不要となった細胞を排除するための予めプログラムされた細胞の死であると理解されていた。アポトーシスを起こした細胞では、核の収縮や DNA の断片化が観察され、膜を残したまま細胞が退縮する。生体中では、やがて退縮した細胞を貪食細胞が捕食し排除する。アポトーシスに対して、壊死と呼ばれる細胞死は細胞構造の破壊を伴う。したがって、細胞が自ら死滅していくアポトーシスは、しばしば、「きれいな細胞死」と呼ばれる。

その後、発生過程で観察される細胞死と同様の細胞死が、細胞の外から刺激によっても誘導されていることが知られるようになった。たとえば、TNF や Fas は、アポトーシスを誘導する代表的なサイトカインである。また、紫外線や放射線照射、細胞増殖因子の枯渇、ある種の癌遺伝子の活性化といった刺激によっても、アポトーシスは誘導される。自己免疫疾患や癌のような疾患も、アポトーシスの機能不全によって、有害な細胞を死滅させられなかった結果として理解されるようになった。

現在では、アポトーシスに関連する分子が次々に明らかにされ、アポトーシスの全体像が次第に明らかにされつつある。しかし、アポトーシスの仕組みの解明には至っていない。

現在のところ、細胞が外界からの刺激に応答してアポトーシスに至る過程は、およそ次のように説明されている。すなわち、様々な原因によって活性化された Caspase ファミリーが細胞死をもたらすことが明らかにされている。Caspase には基質特異性の異なる複数の酵素の存在が明らかにされており、一群の Caspase を総称して Caspase ファミリーと呼んでいる。Caspase ファミリーは、基質特異性によって大きく3つのグループに分類されている。このうち、グループ2の Caspase が、アポトーシスの実行に関与すると言われている。グループ3の Caspase は、アポトーシス実行カスケードの上流において、細胞外からの刺激に応答して活性化され、より下流のグループ2の Caspase を活性化する働きを持つ。一方グループ1の Caspase は、サイトカインの生成と分泌を促進する作用を持つとされている。グループ2とグループ3に分類される Caspase と、それが認識するアミノ酸配列を以下に示す。

グループ2

Caspase-2	DEHD
Caspase-3	DEVD
Caspase-7	DEVD

グループ3

Caspase-6	VEHD
Caspase-8	LETD
Caspase-9	LETD

グループ3の Caspase は、Fas や TNF レセプターにリガンドが結合することにより活性化され、グループ2の Caspase を切断して活性化し、より下流にシグナルを伝達する。このようなシグナルの伝達をアポトーシス実行カスケードと呼ぶ。

アポトーシス実行カスケードの下流では、シグナルを伝達された様々な因子が、細胞死をもたらすための実行部隊として機能していることが推測される。しかし、実際にどのような因子が細胞の死をもたらしているのかについては、解明すべき課題が多い。たとえば、ある種の Caspase はヌクレアーゼ阻害因子 ICAD (inhibitor of CAD) を分解する。その結果、ヌクレアーゼである CAD (Caspase Activated DNase) の核への移行が可能となり、アポトーシスに特徴的な染色体 DNA の切断を開始することが知られている (Enari M. et al., Nature, 391 :43-50, 1998)。

このように、アポトーシス実行カスケードの下流を構成する因子には、アポトーシスの実行において重要な働きを持つ分子が多く存在すると考えられる。これらの因子は、アポトーシスの制御において重要な標的となる可能性がある。

発明の開示

本発明は、新規なアポトーシス関連因子の提供を課題とする。

本発明者らは、新規なヒト遺伝子の単離を目的として、オリゴキャップ法によって調製したヒト cDNA ライブラリーから数多くの全長 cDNA クローンを単離した。そしてこれらの全長 cDNA クローンについて、アポトーシス関連遺伝子をアライメントに基づいて解析した。その結果、これら全長 cDNA クローンのうちの一つである NT2RM1000558 が、アポトーシスのシグナル伝達に重要といわれている Death Effector Domain (DED) モチーフと Caspase ファミリーによる切断認識配列を有することを見出した。この全長 cDNA クローンは、NT-2 神経前駆細胞の cDNA ライブラリーからクローニングされた遺伝子である。

NT2RM1000558 は、326 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしていた。またそのアミノ酸配列の解析により、Caspase ファミリーによる切断認識配列で消化されると、C 末端側の 23 アミノ酸残基が除かれて、303 アミノ酸残基からなる蛋白質となることが推測された。その他、本発明の蛋白質には、26-10

3位のDED、100-109位、および152-174位の核移行シグナル(Nuclear Localization Signal; NLS)等のモチーフが見出された。

ところでDEDDと名付けられた蛋白質(Alexander H. Stegh et al. 1998 The EMBO Journal 17, 20, 5974-5986. Chandra P. Leo et al, 1998 139, 12, 4838-4848)が公知である。DEDDは318アミノ酸残基からなる蛋白質で、DED、NLS、そしてCaspase消化ドメインを含む点で、本発明のアポトーシス関連因子と類似の構造を持つ。しかし、たとえば同じDEDにおける両者のアミノ酸配列(DEDD:配列番号:9)を比較してみても、その相同性は43%に過ぎず、両者は明らかに異なる蛋白質である。また、DEDDのアポトーシス実行カスケードにおける役割も、十分に明らかにされていない。

次に本発明者らは、NT2RM1000558によってコードされる326アミノ酸残基(配列番号:4)からなる蛋白質と、それが消化されて生成する303アミノ酸残基(配列番号:2)からなる蛋白質の活性を確認した。その結果、326アミノ酸残基の蛋白質ではアポトーシス誘導活性が認められないのに対して、303アミノ酸残基の蛋白質は、明らかなアポトーシス誘導活性が確認された。本発明は、これらの知見に基づいて完成された。すなわち本発明は、具体的には以下のタンパク質、DNA、並びにそれらの用途に関する。

〔1〕下記(a)から(d)のいずれかに記載のアポトーシス誘導活性を持つ蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(a) 配列番号:1に記載された塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(b) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

- (d) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、
- 〔2〕 配列番号：1に記載の塩基配列と60%以上のホモロジーを有する〔1〕に記載のポリヌクレオチド。
- 〔3〕 下記(e)から(h)のいずれかに記載の、アポトーシス誘導活性を持つ蛋白質の前駆体をコードするポリヌクレオチド。
- (e) 配列番号：3に記載の塩基配列の蛋白質コード領域を含むポリヌクレオチド、
- (f) 配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、
- (g) 配列番号：4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、
- (h) 配列番号：3に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、
- 〔4〕 配列番号：3に記載の塩基配列と60%以上のホモロジーを有する〔3〕に記載のポリヌクレオチド。
- 〔5〕 〔1〕または〔3〕に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- 〔6〕 配列番号：3に記載の塩基配列を含む遺伝子と、分子進化上、同一の遺伝子をコードするポリヌクレオチド。
- 〔7〕 配列番号：4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質に対してドミナントネガティブの形質を持つタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

- 〔 8 〕 配列番号： 4 に記載のアミノ酸配列において、 3 0 0 - 3 0 3 位のアミノ酸配列が caspase 耐性のアミノ酸配列に改変されたアミノ酸配列をコードする〔 7 〕に記載のポリヌクレオチド。
- 〔 9 〕 〔 1 〕、〔 3 〕、〔 5 〕、〔 6 〕、および〔 7 〕のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質。
- 〔 1 0 〕 〔 1 〕、〔 3 〕、〔 5 〕、〔 6 〕、および〔 7 〕のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
- 〔 1 1 〕 〔 1 〕、〔 3 〕、〔 5 〕、〔 6 〕、および〔 7 〕のいずれかに記載のポリヌクレオチド、または〔 1 0 〕に記載のベクターを保持する形質転換体。
- 〔 1 2 〕 〔 1 1 〕に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、〔 9 〕に記載のタンパク質の製造方法。
- 〔 1 3 〕 〔 1 〕、〔 3 〕、〔 5 〕、〔 6 〕、および〔 7 〕のいずれかに記載のポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなる少なくとも 1 5 塩基の長さを有するポリヌクレオチド。
- 〔 1 4 〕 〔 9 〕に記載の蛋白質に対する抗体。
- 〔 1 5 〕 〔 9 〕に記載の蛋白質と、〔 1 4 〕に記載の抗体の免疫学的な反応を観察する工程を含む、免疫学的測定方法。
- 〔 1 6 〕 次の工程を含む、アポトーシスを制御する物質をスクリーニングする方法。
- (1) 〔 1 〕または〔 3 〕に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質を発現する細胞に候補物質を接触させる工程、および
- (2) アポトーシスが誘導される条件下で前記細胞を培養し、アポトーシスを抑制、または促進する候補物質を選択する工程
- 〔 1 7 〕 次の工程を含む、アポトーシスを制御する物質をスクリーニングする方法。

- 7 -

(1) 配列番号：3に記載の塩基配列からなる遺伝子の発現制御領域と、その下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、

(2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、および

(3) 対照と比較して、工程(2)におけるレポーター活性を増加または減少させる候補物質を選択する工程

〔18〕 細胞増殖、または細胞死の制御における〔16〕、または〔17〕に記載の方法によって得ることができる化合物の使用。

〔19〕 〔16〕、または〔17〕に記載の方法によって得ることができる化合物を主成分として含有することを特徴とする、細胞増殖、または細胞死に特徴付けられる疾患の治療剤。

本発明は、アポトーシス誘導活性を有する蛋白質をコードする新規なポリヌクレオチドに関する。本発明によるポリヌクレオチドに含まれるヒト由来のポリヌクレオチドの塩基配列を配列番号：1、あるいは配列番号：3に示す。また、本発明のポリヌクレオチドがコードする蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：2、あるいは配列番号：4に示す。本発明のポリヌクレオチドとしては、本発明の蛋白質をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNAの他、ゲノムDNA、化学合成DNA、RNAなども含まれる。また、本発明の蛋白質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。更に本発明のポリヌクレオチドは、他の蛋白質やオリゴペプチドをコードするポリヌクレオチドと融合したものであることができる。本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、上記のように、配列番号：1、または3に記載の塩基配列もしくはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれら塩基配列の情報に基づき設計したプライマーを用いたPCR法等の常法により単離することが可能である。

配列番号：2に示すアミノ酸配列からなる本発明の蛋白質は、哺乳動物細胞に

において、アポトーシス誘導活性を示す。一方、配列番号：4に示すアミノ酸配列からなる蛋白質は、哺乳動物細胞においてアポトーシスを誘導する活性が認められない。配列番号：4に示すアミノ酸配列は、N末端から300-303位置にCaspase消化ドメイン(Caspase Cleavage domain)に相当するアミノ酸配列(DEAD)を含んでいる。配列番号：2に示すアミノ酸配列は、このCaspase消化ドメインで消化されたときに生成する蛋白質のアミノ酸配列に相当している。したがって本発明においては、アポトーシス誘導活性を持つ蛋白質を活性型と呼ぶ。一方、配列番号：4のアミノ酸配列からなる蛋白質のように、何らかのプロセスを経て活性型の蛋白質を生成するが、その蛋白質自身にはアポトーシス誘導活性を見出せない蛋白質も本発明に含まれる。このような蛋白質を、本発明においては不活性型と言う。本発明における不活性型の蛋白質は、Caspaseのようなプロテアーゼや、あるいは化学的な処理により活性型の蛋白質を生成することができる蛋白質と定義することができる。

さて、配列番号：4のアミノ酸配列に見出されるCaspase消化ドメインは、アミノ酸配列DEADからなる。このアミノ酸配列を認識するCaspaseは、ヒトではCaspase 3および7である。Caspase 3および7は、グループ3に属するCaspaseで、Caspaseファミリーの中では、アポトーシス実行カスケードの下流を構成している。したがって、本発明の蛋白質である活性型の蛋白質は、様々な原因によってトリガーされるアポトーシス実行カスケードの下流において、その進行にとって重要な工程に関与していると言える。そのため、本発明の蛋白質の生成や、あるいはこの蛋白質の作用を調節することによって、アポトーシスの調節を達成できるものと考えられる。すなわち本発明は、アポトーシスを調節することができる物質と、そのスクリーニング方法に関する。本発明の蛋白質の生成や、あるいはこの蛋白質の作用を調節することができる物質によって、アポトーシスを調節することができる。このような物質は、後に述べるようなスクリーニング方法によって単離することができる。

より具体的には、生体内における前記活性型蛋白質の生成を阻害すれば、アポトーシスの進行を効果的に抑制できる。あるいは、前記活性型蛋白質の働きを阻害することによっても、アポトーシスの抑制が達成される。前記蛋白質の発現を阻害するには、アンチセンス核酸医薬や、あるいはその転写調節領域を明らかにした上でデコイ核酸によって発現を阻害することができる。活性型の蛋白質の働きそのものを阻害するには、この蛋白質に結合する化合物の投与によって活性部位の立体構造に変化を与えたり、あるいは活性型蛋白質とその標的化合物との結合を妨げることが有効である。あるいは、ドミナントネガティブ効果によって本発明の蛋白質の機能を低下させることもできる。

逆に、特定の細胞において前記蛋白質の生成や活性を刺激することができれば、その細胞にアポトーシスをもたらすことができる。たとえば、癌細胞に対して、特異的に前記蛋白質の生成を誘導することができれば、安全に癌の治療を行うことができる。具体的には、癌細胞が有する本発明のアポトーシス関連因子の遺伝子の発現を誘導したり、あるいは癌細胞で特異的に発現するプロモーターとともに、活性型の蛋白質をコードする遺伝子を癌細胞に導入することにより、本発明に基づく治療が可能である。あるいは、本発明による不活性型の蛋白質のアミノ酸配列中におけるCaspase消化ドメインを、癌細胞で高度に発現されるプロテアーゼによって特異的に認識されるアミノ酸配列に改変することによって、癌の治療に有用な蛋白質を得ることもできる。このような蛋白質は、癌細胞でのみ活性型の蛋白質を生成する安全な医薬として用いることができる。

また、本発明の蛋白質を用いて、この蛋白質を介したアポトーシスに関与する新たな因子を取得することができる。たとえば、Death Effector Domain (DED) を持つ蛋白質は、Fas-associated death domain protein (FADD) とcaspase8との結合のように、それぞれのDEDどうしの結合を介して行われている。そこで、本発明の蛋白質のDEDを用いて、これに結合する新規なDEDを有する因子を取得できる。具体的には、本発明の蛋白質のDEDをベイトとした酵母のtwo-hybrid法 (A novel

genetic system to detect protein-protein interactions. Fields S. and Song O. (1989) Nature 340:245-246) を用いて、ほ乳類細胞や組織由来のcDNAライブラリーの中から、本発明の蛋白質のDEDに結合するDEDを持つ新規な因子を取得できる。

さらに、たとえば、本発明による不活性型蛋白質を用いて、そのCaspase消化ドメインを認識する新規なCaspaseも取得できる。具体的には、不活性型蛋白質を標識したものを基質として、活性化caspaseが含まれる蛋白質溶液との反応を行い、反応液をSDS-PAGEなどを用いて本発明の不活性型蛋白質から活性化型への移行を指標にすることによって、これらのCaspaseを単離することができる。本発明の蛋白質が新規な蛋白質であることから、それを消化するCaspaseもCaspase 3や7以外の新規なCaspaseである可能性がある。

あるいは、本発明の活性型蛋白質が、他の因子と共同してアポトーシスをもたらしている場合には、本発明の活性型蛋白質を用いて、このような因子を単離することができる。このような因子としては、CD95 (Fas) によるアポトーシスシグナルにおいて、その作用を誘導する重要な役割を担っている因子として、FADDやcaspase8などの蛋白質が考えられる。このようなDEDを持ちアポトーシスシグナルに関与する新規蛋白質は、HEK293T細胞などのほ乳類細胞に本発明の活性型蛋白質との共発現によるアポトーシスの測定によって単離することができる。

本発明の蛋白質は、組み換え蛋白質として、また天然の蛋白質として調製することが可能である。組み換え蛋白質は、例えば、後述するように本発明の蛋白質をコードするDNAを挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現した蛋白質を精製することにより調製することが可能である。また、インビトロトランスレーション（例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M. C., Jackson, R. J. (1989) Nucleic Acids Res. 17:3129-3144」参照）などにより本発明の蛋白質を調製することも可能である。一方、天然の蛋白質は、例えば、後述する本

発明の蛋白質に対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

また、本発明には、配列番号：2、あるいは配列番号：4に示したアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチドが含まれる。ここで「機能的に同等」とは、対象となる蛋白質が、アポトーシス誘導活性を持つ場合、その蛋白質は本発明の活性型の蛋白質と機能的に同等であると言えることができる。あるいは、なんらかのプロセスを経てアポトーシス誘導活性を持った活性型の蛋白質を生成しうる蛋白質は、本発明の不活性型の蛋白質と機能的に同等である。不活性型の蛋白質から活性型の蛋白質を生成するための、プロセスは限定されない。たとえば配列番号：4に示すアミノ酸配列からなる蛋白質の場合には、Caspase消化ドメインにおける消化が、活性型蛋白質の生成に必要である。この領域を他のCaspaseや、更にCaspase以外のプロテアーゼの認識配列におきかえれば、対応する酵素の作用によって活性型の蛋白質を生成する不活性型蛋白質とすることができる。アポトーシス誘導活性は、たとえば実施例に記載したように、当該蛋白質をコードする遺伝子を哺乳動物細胞に発現させ、その細胞のアポトーシスを観察することによって確認することができる。アポトーシスは、細胞の形態学的な変化や、染色体DNAの切断を指標として確認することができる。

これら本実施例において同定された蛋白質と機能的に同等な蛋白質は、当業者であれば、例えば、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法（例えば、部位特異的変異誘発法 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 8.1-8.5)）を利用して調製することができる。また、このような蛋白質は、自然界におけるアミノ酸の変異

により生じることもある。本発明には、このように本実施例において同定された蛋白質と同等の機能を有する限り、そのアミノ酸配列（配列番号：2、または4）において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加などにより異なる蛋白質も含まれる。

蛋白質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内である。置換されるアミノ酸は、蛋白質の機能の保持の観点から、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trpは、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Glnが挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが挙げられる。また、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、Hisが挙げられる。

また、本実施例において同定された蛋白質と機能的に同等な蛋白質は、当業者に周知のハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子増幅技術を利用して単離することも可能である。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術（Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 6.3-6.4）を用いて本実施例において同定された蛋白質をコードする塩基配列（配列番号：1、または3）またはその一部をもとにこれと相同性の高いポリヌクレオチドを単離して、このポリヌクレオチドから機能的に同等な蛋白質を得ることは、通常行いうることである。本発明には、本実施例において同定された蛋白質と同等の機能を有する限り、これら蛋白質をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質も含まれる。機能的に同等な蛋白質を単離する生物としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ等の脊椎動物が挙げられるが、これらに制限されない。これらの動物からは、本発明によるアポトーシス関連因

子の遺伝子と分子進化上同一の遺伝子を起源とする遺伝子を単離することができる。なお本発明において「分子進化上同一の遺伝子を起源とする」とは、そのDNA塩基配列分析、生理学的役割等の解析により、分子進化上、ヒトにおける本発明のアポトーシス関連因子と同一の遺伝子を起源として進化してきたと合理的に判断される遺伝子を言う。このような遺伝子は、その塩基配列において、高度な相同性を維持している。

機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションのストリンジェントな条件は、通常は洗浄のための条件として「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度であり、さらに厳しい条件としては「0.1xSSC、0.1% SDS、65℃」程度であり、ハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離される蛋白質は、配列番号：2、または4に記載の本発明の蛋白質と比較して、通常、そのアミノ酸配列または該タンパク質をコードする塩基配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも60%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上（例えば、90%以上）の配列の同一性を指す。相同性の特定は、BLAST2検索アルゴリズム(Altschul, S.F. et al, 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.)を用いて決定することができる。

また、遺伝子増幅技術（PCR）（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4）

を用いて、本実施例において同定された塩基配列（配列番号：1、または3）の一部をもとにプライマーを設計し、これら塩基配列またはその一部と相同性の高いDNA断片を単離して、これをもとに本実施例において同定された蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることも可能である。

あるいは本発明は、本発明の蛋白質に対してドミナントネガティブの形質を有する蛋白質をコードするDNAに関する。ドミナントネガティブの形質を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、その発現によって、細胞がもともと備えている内在性の野生型蛋白質の活性を消失もしくは低下させる機能を有する。たとえば、本発明のアポトーシス関連因子におけるDEAD配列に相当する部分を、Caspaseによって切断されないアミノ酸配列に改変すれば、活性型の蛋白質を生成することの無い不活性体とすることができる。このようなアミノ酸配列をコードする遺伝子を細胞内に発現させれば、本発明のアポトーシス関連因子の発現をドミナントネガティブ効果（不活性型の拮抗阻害）により抑制する。したがって、ウイルスベクター等の遺伝子導入技術によって、不活性体遺伝子を上記疾患患者に導入発現させることで、アポトーシスの進行を阻害することができる。

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを提供する。部分ペプチドは、本発明の蛋白質に対する抗体を得るための免疫原として有用である。特に、他の蛋白質との相同性が低い、本発明の蛋白質に固有のアミノ酸配列を含む部分ペプチドは、本発明の蛋白質に対して特異性の高い抗体を与える免疫原として期待される。

その他、本発明のアポトーシス関連因子、あるいはその不活性型蛋白質の部分ペプチドには、たとえばDEDを有する部分ペプチドが含まれる。いくつかのアポトーシス関連因子の間に見出された保存性の高いアミノ酸配列がDEDである。本発明の蛋白質（活性型、不活性型に共通）の26-103位に相当する78アミノ酸残基が、DEDに相当する。DEDは、アポトーシス実行カスケードにおけるシグナル伝達を担う領域と言われていることから、本発明の蛋白質においてもこの領域は

その活性維持に重要な役割を果たしていると推測される。その他、本発明の蛋白質に見出される核移行シグナル(NLS)ドメインも、その活性を支える重要な部位と考えられる。したがって、この領域を含む部分ペプチドは、この蛋白質の活性を修飾する化合物をスクリーニングするための標的として有用である。

本発明の部分ペプチドは、少なくとも7アミノ酸、好ましくは9アミノ酸以上、より好ましくは12アミノ酸以上、より好ましくは15アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造する。

また本発明は、前記DNAのいずれかを含有する発現ベクターを提供するものである。さらに、本発明は、前記DNA、あるいは前記いずれかの発現ベクターを保持する形質転換体、並びにその形質転換体を培養し、その培養物から本発明の蛋白質を単離することからなる、アポトーシス関連因子、あるいはその部分ペプチドの製造方法に関するものである。さらに本発明は、上記の方法で製造されたアポトーシス関連因子、あるいはその部分ペプチドを提供するものである。

遺伝子組換え手法でポリペプチドを生産する場合、宿主細胞の種類により、目的ポリペプチドのグリコシル化の種類や程度の異なったものが得られることや、いわゆるポリペプチドの分泌生産法において、宿主細胞中で発現された前駆体ポリペプチドの末端(N-末端および/またはC-末端)アミノ酸配列がシグナル・ペプチダーゼ等によりプロセッシングを受け、種々の末端アミノ酸配列を持つポリペプチドが得られることは当業者に周知である。従って、そのようなポリペプチドも本発明の蛋白質の範囲に含まれることは、当業者ならば容易に理解し得ることである。

下記実施例には、発現ベクターとして哺乳類動物細胞内で機能するベクターの構築例のみが示されている。しかしながら、本発明の蛋白質をコードするDNAが開示されている結果、これらに基づいて、酵母等の真菌類、並びに原核性細胞

宿主に導入したとき、該宿主に本発明の蛋白質を発現、産生させ得る発現ベクターを構築することは、当業者にとって容易である。従って、本発明は、本発明のDNA配列に基づき、当該技術分野既知の方法で構築される発現ベクターをも包含するものである。

本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドを発現させるために用い得る微生物細胞には、例えば、原核性の細菌[大腸菌(*Escherichia coli*)や枯草菌(*Bacillus subtilis*)]および真核性の酵母[例えばパン酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)]がある。また、哺乳類細胞には培養ヒト細胞および培養動物細胞が含まれる。さらには培養植物細胞も用い得る。

微生物の例としてはエシェリキア属に属する細菌やパン酵母がある。より具体的には、例えば次のような菌株を微生物宿主として挙げることができる。

エシェリキア属に属する細菌

E. coli HB 101 (ATCC 33694)

E. coli HB 101-16 (FERM BP-1872)

E. coli MM294 (ATCC 31446)

E. coli DH1 (ATCC 33849) 等

パン酵母

S. cerevisiae AH22 (ATCC 38626) 等

哺乳動物細胞の例としてはヒト胎児腎臓由来HEK 293細胞、マウスL 929細胞およびチャイニーズ・ハムスター・オバリー(CHO)細胞等がある。

通常、原核生物である細菌、特に大腸菌を宿主細胞として用いる場合、発現ベクターは少なくともプロモーター、開始コドン、本発明の蛋白質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、終止コドンおよび自己複製可能ユニットから構成される。真核生物、即ち酵母や哺乳動物細胞を宿主細胞として用いる場合、発現ベクターは、少なくともプロモーター、開始コドン、本発明の蛋白質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドおよび終止コドンから構成されるのが好ま

しい。さらにエンハンサー配列、本発明の蛋白質の5'-および3'-非コード領域、ポリアデニル化部位および自己複製可能単位を挿入することもできる。

上記の自己複製可能単位は、形質転換体の選択マーカー(たとえば、アンピシリン耐性)を含有していることが好ましい。細菌を宿主とする発現ベクターの場合、プロモーターという語句は、プロモーター、オペレーターおよびシャイン・ダルガーノ(SD)配列(たとえばAAGG等)からなるプロモーター・オペレーター領域を意味する。そのようなプロモーターの例としては、慣用のプロモーター・オペレーター領域(たとえば、ラクトースオペロン、PLEプロモーター、trpプロモーター等)が挙げられる。酵母を宿主とする発現ベクターに用いられるプロモーターの例としてはpho5プロモーターが挙げられる。更に、精製を容易に行うことを目的として、金属イオンキレートに対する親和性を持つ塩基性アミノ酸を、本発明の蛋白質におけるいずれかの末端に付加することができる。

塩基性アミノ酸を付加する場合には、希望のアミノ酸をコードする塩基配列が連続した塩基配列を5'側に付加したプライマーを用いて、PCRを行えば、目的とする遺伝子の任意の末端に、オリゴペプチドを付加することができる。塩基性アミノ酸としては、ヒスチジン、リジン、あるいはアルギニンなどを用いることができる。

哺乳動物細胞における発現ベクターに用いられるプロモーターの例としては、HTLV-LTRプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、CMVプロモーター、マウス・メタロチオネインI(MMT)-プロモーター等が挙げられる。好ましい開始コドンの例としてメチオニンコドン(ATG)が挙げられる。

本発明の蛋白質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、たとえば、DNA合成装置を用いて、部分合成または全合成することによって得ることができる。あるいは、ヒトcDNAライブラリーより、配列番号:1あるいは配列番号:3に記載の塩基配列に基づいて設定したプローブやプライマーを用いて取得することができる。更に、ゲノムDNAを常法通り処理する(たとえば、制限酵素によ

る消化、細菌アルカリホスファターゼによる脱リン酸化、T4ポリヌクレオチドキナーゼによるリン酸化、T4DNAリガーゼを用いたライゲーション)ことによって、本発明の蛋白質をコードするゲノムDNAを調製することができる。更にこのようにして取得したゲノムDNAを利用し、ゲノムにおける本発明の遺伝子の転写開始点を明らかにし、より上流に位置する発現制御領域を特定することができる。本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現を制御するプロモーターやエンハンサー等の制御領域は、本発明の蛋白質の発現異常を検出するための標的領域として有用である。あるいは、これらの領域を標的とするデコイ核酸医薬などにより、発現制御を実現することができる。

本発明の蛋白質のうち、活性型の蛋白質は、少なくともヒト細胞に対して致死的に作用する。したがって、哺乳動物細胞においては、活性型の蛋白質を誘導可能なプロモーターと組み合わせて発現させるのが望ましい。このようなプロモーターには、温度感受性プロモーターや薬剤感受性プロモーターなどが公知である。これらのプロモーターは、特殊な培養条件を与えることによって初めて活性化される。したがって、十分に細胞が発育した段階で、発現を誘導することができる。

本発明の実施に必要な、DNAのクローニング、各プラスミドの構築、宿主のトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からの蛋白質の回収等の操作は、当業者既知の方法、あるいは文献記載の方法[Molecular Cloning 2nd. edition, T. Maniatis et. al, Cold Springs Harbor Laboratory (1989), DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985) 他]に準じて行なうことができる。

また、本発明の宿主細胞には、本発明のアポトーシス関連因子の機能解析やこの蛋白質を利用したその機能阻害剤や機能促進剤のスクリーニングのために用いる目的の細胞も含まれる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの方法

で行うことが可能である。形質転換体からの本発明の蛋白質の調製は、当業者に公知の蛋白質の分離・精製法を利用して行なうことができる。

本発明はまた、配列番号：1、または3に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T (A:U)、G:Cの塩基対からなる2本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。

このようなポリヌクレオチドは、本発明の蛋白質をコードするDNAやRNAを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のポリヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp~100bp、好ましくは15bp~35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも15bpの鎖長のポリヌクレオチドが用いられる。プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的である必要があるが、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

本発明のポリヌクレオチドは、本発明の蛋白質の異常を検査・診断するために利用することができる。例えば、本発明のポリヌクレオチドをプローブやプライマーとして用いたノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCRにより、発現異常を検査したり、本発明のポリヌクレオチドをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によりゲノムDNA-PCRやRT-PCRにより本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドやその発現制御領域を増幅し、RFLP解析、SSCP、シーケンシング等の方法により、配列の異常を検査・診断することができる。本発明において「発現」とは、転写および/または翻訳が含まれる。本発明のポリヌクレオチド

を用いた発現の解析により、遺伝子の転写レベルでの発現を検査・診断することができる。また、後述の本発明のタンパク質に対する抗体を用いれば、遺伝子の翻訳レベルでの発現を検査・診断することができる。

また、「配列番号：1、または3に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド」には、本発明の蛋白質の発現を抑制するためのアンチセンスポリヌクレオチドが含まれる。アンチセンスポリヌクレオチドは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp、さらに好ましくは500bp以上の鎖長を有し、通常、3000bp以内、好ましくは2000bp以内の鎖長を有する。

このようなアンチセンスポリヌクレオチドには、本発明の蛋白質の異常（機能異常や発現異常）などに起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。具体的には、虚血性疾患による組織の障害においては、アポトーシスが重要なステップとなっている。したがって、血流障害を起こした組織における本発明の蛋白質の発現を阻害できれば、虚血性疾患にともなう組織損傷を軽くすることができる。該アンチセンスDNAは、例えば、配列番号：1、または3に記載のポリヌクレオチドの配列情報を基にホスホロチオエート法（Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988)）などにより調製することが可能である。

本発明のポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、ex vivo法やin vivo法などにより患者へ投与を行う。

本発明は、また、本発明の蛋白質に結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。

さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の場合には、本発明の蛋白質または部分ペプチドを家兎に免疫することにより得ることが可能であり (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.12~11.13)、一方、モノクローナル抗体の場合には、本発明の蛋白質または部分ペプチドを用いてマウスを免疫し、脾臓細胞と骨髓腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。

本発明の蛋白質に結合する抗体は、本発明の蛋白質の精製に加え、例えば、これら蛋白質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などから蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA等の方法による本発明の蛋白質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。

本発明の蛋白質に結合する抗体は、本発明の蛋白質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウス (例えば、「Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice, Mendez, M.J. et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156」参照) に免疫することにより調製することができる。また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組み換えによって調製することができる (Methods in Enzymology 203, 99-121 (1991))。

また、本発明は、本発明の蛋白質の活性を調節する化合物のスクリーニング方法を提供する。本発明の蛋白質は細胞死を引き起こすことから、当該遺伝子の産物の活性を抑制する化合物は細胞死を抑制する治療薬・試薬などとして有用であ

る。このスクリーニング方法は、次の工程を含む。

- (1) 本発明の蛋白質を発現する細胞に候補化合物を接触させる工程、および
- (2) アポトーシスが誘導される条件下で前記細胞を培養し、アポトーシスを抑制、または促進する候補化合物を選択する工程、

本発明の蛋白質を発現する細胞とは、活性型、または不活性型の蛋白質を発現する細胞が含まれる。

活性型を発現する細胞は、アポトーシスに直結するので、そのままでは効率的なスクリーニングが期待できない。そこで、制御可能なプロモーター配列の下流に当該遺伝子（活性型の）を結合させた発現プラスミドを利用することができる。制御可能なプロモーターとしては、例えばメタロチオネインプロモーターなどを示すことができる。このようなプロモーターの制御下に本発明の活性型蛋白質をコードする遺伝子を発現するプラスミドを、HEK293のような動物細胞に形質転換する。このようにして得られた形質転換体は、プロモーターを活性化させた条件下で細胞死を引き起こす。

例えばこの形質転換体を 96 ウェルマルチプレートに播種し、スクリーニングの対象となる候補化合物を各ウェルに加えた後にプロモーターを活性化させる。その結果、対象と比較してアポトーシスを抑制（または促進）する候補化合物を選択することにより、本発明の蛋白質の作用を調節する化合物を選択することができる。本方法は動物細胞ばかりでなく同様なシステムで細胞死を引き起こすような宿主であれば、真核生物・原核生物を問わず用いることが可能である。

一方、不活性型の蛋白質を発現する場合には、細胞を活性型を生じる条件に置くことにより活性型蛋白質の生成を誘導する。具体的には、たとえば不活性型が caspase 認識配列の切断によって活性型となる場合には、必要な caspase を発現する細胞に、不活性型の蛋白質を発現させる。あるいは、caspase 以外のプロテアーゼによって切断されるアミノ酸配列に改変された変異体の場合には、必要なプロテアーゼを産生する細胞を利用すれば良い。このようなプロテアーゼは、人

為的に導入されたものであることもできるし、もともとその細胞が備えている酵素を利用することもできる。いずれにせよ、活性型の生成に必要なプロテアーゼ活性がアポトーシスに直結することから、その産生は制御可能なものであることが望ましい。

本発明のスクリーニングは、アポトーシスを指標として行われる。アポトーシスを検出する方法は公知である。具体的には、細胞の形態の変化や DNA の断片化を指標としてアポトーシスを検出する方法が一般的である。アポトーシスによる細胞の形態学的な変化は、ギムザ染色や蛍光染色の染色像の変化として観察される。あるいは DNA の断片化は、TUNEL 法 (Gavriel Y et al, 1992 J Cell Biol, 119:493-501) によって検出することができる。さらに、アポトーシスの初期を検出する方法として、構造変化した細胞膜に結合する蛍光標識 Annexin V とフローサイトメーターで測定する Annexin V 法などがある (Vermes I, et al. J Immunol Methods. 1995 Jul 17;184(1):39-51.)。

本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物には、以下のようなシステムによって本発明の蛋白質の作用を調節する化合物が含まれる。

- (1) 本発明の蛋白質が活性型への切断を受ける過程を阻害（または促進）する
- (2) 本発明の蛋白質の産生そのものを阻害（または促進）する
- (3) 活性化 Caspase による本発明の不活性型蛋白質の切断を阻害（または促進）する

本発明の遺伝子発現産物の細胞内での増加は、何らかの刺激による細胞死を容易に促進する可能性がある。そこで、当該遺伝子の発現を制御する化合物あるいは細胞死を促進する化合物は各種病態（例えば脳梗塞あるいはガンなど）の治療薬・試薬など、として有用である可能性が推測される。遺伝子の発現制御を観察するには、レポーターアッセイを利用することができる。本発明は、本発明に基づいて取得することができる配列番号：3 に記載の塩基配列からなる遺伝子の発現制御領域を利用したレポーターアッセイによるアポトーシスを調節する物質を

スクリーニングするためのに関する。本発明のスクリーニング方法は、次の工程を含む。

- (1) 配列番号：3に記載の塩基配列からなる遺伝子の発現制御領域と、その下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、
- (2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、および
- (3) 対照と比較して、工程(2)におけるレポーター活性を増加または減少させる候補物質を選択する工程

配列番号：3に記載の塩基配列からなる遺伝子の発現制御領域は、染色体DNAから公知の方法によってクローニングすることができる。たとえばS1マッピング法が転写開始点の特定方法として公知である（「転写調節領域の単離」および「転写制御因子の同定と精製」、「細胞工学 別冊8 新細胞工学実験プロトコール」、東京大学医科学研究所制癌研究部編 秀潤社1993年、p362-374）。一般に当該遺伝子の発現制御領域DNAは、ヒト染色体ライブラリー（genomic library）を、当該遺伝子の5'末端の15～100bp、好ましくは30～50bpをプローブDNAに用いてスクリーニングすることにより、発現制御領域を含む遺伝子クローンとしてクローニングされる。このようにして得られたクローンはしばしば10kbp以上の当該遺伝子の5'非翻訳領域を包含している。そこで、これらのクローンの5'末端をエキソヌクレアーゼ処理などによって短縮化、あるいは断片化する。短縮された発現制御領域を含む配列でレポーター遺伝子の発現の強さや発現の制御についての評価を行うことによって、発現制御領域の活性維持のための最小必要単位を得ることができる（deletion study）。

また、遺伝子の発現制御領域をNeural Network を用いて予測するプログラムが公知である（http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html, Reese, M.G., et al, "Large Scale Sequencing Specific Neural Networks for Promoter and Splice Site Recognition" Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Sym

posium, edited by Lawrence Hunter and Terri E. Klein, World Scientific Publishing Co, Singapore, January 2-7, 1996)。あるいはPromoter Scanのような転写因子結合配列を検索して発現制御領域を予測するプログラムを用い活性の最小単位を予測することも行われている(<http://biosci.cbs.umn.edu/software/proscan/promoterscan.htm>, Prestidge, D.S. 1995, Prediction of Pol II Promoter Sequence using Transcription Factor Binding Sites. J. Mol. Biol. 249: 923-932)。また、予測されたコアの部分を中心にdeletion studyを実施することもできる。

このようにして単離された本制御領域遺伝子の下流に、レポーター遺伝子を機能的に結合させた発現プラスミドを作製し、本発現プラスミドを適当な細胞に導入する。本発明において、機能的な結合とは、前記発現制御領域の活性化によって、レポーター遺伝子の転写が開始されるように両者を結合することを意味する。レポーター遺伝子には、前記発現制御領域の活性化を遺伝子の発現として観察することができる蛋白質をコードするものであれば任意の遺伝子を利用することができる。具体的には、例えばルシフェラーゼ、 β ガラクトシダーゼ、GFP (Green Fluorescent Protein) などの遺伝子がレポーター遺伝子として一般に用いられる。ベクターを導入する細胞には、例えば当該遺伝子を欠失させた動物細胞を用いることができる。

このようにして得られた株化細胞は細胞死（アポトーシス）を引き起こすような条件下でプロモーターが活性化され、レポーター遺伝子によるシグナルを生成する。得られた細胞を96ウェルマルチプレートに播種し、アポトーシスを引き起こす条件下で培養を開始する。このときスクリーニングの対象となる化合物を各ウェルに加えることにより、当該遺伝子の発現産物の発現を抑制するあるいは促進化合物が容易に選択することができる。物質の選択法としては例えば、レポーター遺伝子としてGFPを用いた場合、薬物を加えない状態および加えない場合でのGFPの発光量の比較を行うことにより選択が可能である。比較とは2倍以上もし

くは1/2以下、好ましくは5倍もしくは1/5以下、より好ましくは10倍以上もしくは1/10以下の発光量比を示す場合のことを示唆している。本方法は動物細胞ばかりでなく同様なシステムで細胞死を引き起こすような宿主であれば、真核生物・原核生物を問わず用いることが可能である。

本発明のスクリーニングに用いる候補物質としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられる。

このスクリーニングにより単離される化合物は、本発明の蛋白質の活性、あるいはその発現を促進または阻害する化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）の候補となる。また、生体内において、本発明の蛋白質とこれと相互作用する分子との該相互作用を阻害する化合物の候補となる。これら化合物は、本発明の蛋白質が関連する疾患の予防や治療のための医薬品として応用が考えられる。

更に本発明は、本発明のスクリーニングによって得ることができる物質の医薬用途に関する。すなわち本発明は、前記スクリーニングによって得ることができる化合物を主成分として含有する、細胞増殖または細胞死の制御における使用に関する。あるいは本発明は、これらの化合物を主成分として含有することを特徴とする、細胞増殖、または細胞死に特徴付けられる疾患の治療剤に関する。本発明において細胞増殖、または細胞死に特徴付けられる疾患とは、異常な細胞増殖や細胞死によってもたらされる疾患を意味する。たとえば異常な細胞増殖によってもたらされる疾患としては、悪性腫瘍細胞の増殖によってもたらされる癌などを挙げることができる。あるいは細胞死によってもたらされる疾患としては、脳虚血によってもたらされる脳組織障害などを示すことができる。本発明のアポトーシス関連因子の機能や産生そのものを阻害する化合物は、次のような細胞死の制御に利用することができる。

(1) 虚血による細胞死

(2) 慢性ウイルス性疾患における細胞死

他の病原微生物による慢性疾患における細胞死

(3) 自己免疫反応による炎症とそれに伴う細胞死

(4) 原因不明だが細胞死とそれに伴う変性による疾患 (アルツハイマーなど)

これらの細胞死は、例えば次のような疾患によってもたらされる。したがって、本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、次のような疾患の治療に用いることができる。

脳血管障害性痴呆、多発性微小脳梗塞、脳血栓症、脳梗塞、脳出血

神経変性疾患 (アルツハイマーなど)

心筋梗塞、心筋炎

ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、肝硬変

インスリン依存性糖尿病 (膵臓ランゲルハンス島細胞の免疫反応性細胞死による)

虚血性腸炎

全身性の、あるいは局所的な自己免疫疾患に伴う細胞死；全身性汎発性紅斑、皮膚筋炎、慢性関節リウマチ、

AIDS

本発明の蛋白質、ヌクレオチド、抗体および上記スクリーニングにより単離される物質は、アポトーシスを調節するために有用である。これらを医薬品として用いる場合には、それ自体を医薬品として用いることも可能であるが、公知の製剤学的方法により製剤化して用いることも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤などと適宜組み合わせて製剤化して用いることが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺

伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。また本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

発明を実施するための最良の形態

以下本発明を実施例として更に具体的に説明するが、本発明は該実施例に限定されるものではない。

[実施例 1] オリゴキャップ法による cDNA ライブラリーの作製

ヒト胎児精巣由来のテラトカルシノーマ細胞でレチノイン酸処理により神経細胞に分化可能な NT-2 神経前駆細胞 (Stratagene 社より購入) を用いて、cDNA ライブラリーを作製した。まず添付マニュアルに従って、NT-2 細胞をレチノイン酸で誘導しないで培養し、培養細胞を集めて、文献 (J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring harbor Laboratory Press 1989) 記載の方法により mRNA を抽出した。さらに、オリゴ dT セルロースで poly(A)⁺RNA を精製した。

poly(A)⁺RNA よりオリゴキャップ法 [M. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138: 171-174 (1994)] により cDNA ライブラリーを作成した。Oligo-cap linker (agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg/配列番号: 5) およびオリゴ dT プライマー (gcggctgaag acggcctatg tggccttttt tttttttttt tt/配列番号: 6) を用いて文献 [鈴木・菅野, 蛋白質 核酸 酵素, 41: 197-201 (1996)、Y. Suzuki et al., Gene, 200: 149-156 (1997)] の記載にしたがって BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理、TAP (Tobacco Acid Phosphatase) 処理、RNA ライゲーション、第一鎖 cDNA の合成と RNA の除去を行った。次いで、5' (agcatcgagt cggccttgttg/配列番号: 7) と 3' (gcggctgaag acggcctatg t/配列番号: 8) の PCR プライマーを用い PCR (polymerase chain reaction) により 2 本鎖 cDNA に変換し、Sfi

- 29 -

I 切断した。次いで、DraIII で切断したベクター pME18SFL3 に cDNA の方向性を決めてクローニングし、cDNA ライブラリーを作成した。これらより得たクローンのプラスミド DNA について、挿入 cDNA サイズが 1 kb 以下のクローンを除いた後、cDNA の 5' 端と 3' 端の塩基配列を DNA シーケンシング試薬 (Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit または BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems 社製) を用い、マニュアルに従ってシーケンシング反応後、DNA シーケンサー (ABI PRISM 377, PE Biosystems 社製) で DNA 塩基配列を解析した。

オリゴキャップ法で作製したライブラリーの cDNA の 5'-末端の全長率を次の方法で、求めた。公共データベース中のヒト既知 mRNA と 5'-末端配列が一致する全クローンについて、公共データベース中の既知 mRNA 配列より長く 5'-末端が伸びている場合と 5'-末端は短いが翻訳開始コドンは有している場合を「全長」と判断し、翻訳開始コドンを含んでいない場合を「非全長」と判断した。cDNA クローンの 5'-末端の全長率 [全長クローン数 / (全長クローン数 + 非全長クローン数)] をヒト既知 mRNA と比較することにより求めた。その結果、このライブラリー (NT2RM1) の全長率は 69% と評価され、5'-末端配列の全長率が非常に高いことが分かった。

次に、オリゴキャップ法で作成したライブラリーのクローンから、5'-末端配列の中のすべての ATG コドンから予測される推定アミノ酸配列について、中井・金久が開発した蛋白質の局在性予測プログラム「PSORT」を用い、多くの分泌蛋白質のアミノ末端に特徴的なシグナルペプチドと予測される配列の有無を解析することにより、シグナル配列をもつと予測されるクローン (分泌蛋白質、または膜蛋白質の可能性が高い) を特異的に選別した。

更にこうして選択したクローンについて、全長 cDNA の塩基配列、並びに推定アミノ酸配列を決定した。塩基配列は、次に示す 3 種の方法を組み合わせ、各方

法によって決定した塩基配列を完全にオーバーラップさせ、最終的な確定塩基配列を決定した。

(1) Licor DNA シーケンサーを用いた cDNA 挿入断片両末端からのロングリードシーケンス (Licor シーケンサー (アロカ社販売) のマニュアルに従ってシーケンシング反応後、Licor シーケンサーで DNA 塩基配列を解析した) 、

(2) AT2 トランスポゾン試験管内転移を用いた Primer Island 法によるネステッドシーケンス [S. E. Devine and J. D. Boeke, *Nucleic Acids Res.*, 22: 3765-3772, (1994)] (PE Biosystems 社製のキットとマニュアルにしたがってクローンを取得後、PE Biosystems 社製の DNA シーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応し、ABI PRISM 377 で DNA 塩基配列を解析した)

(3) カスタム合成 DNA プライマーを用いたダイデオキシターミネーター法によるプライマーウォーキング (カスタム合成 DNA プライマーをもちい PE Biosystems 社製の DNA シーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応し、ABI PRISM 377 で DNA 塩基配列を解析した)

得られた配列について、ATGpr [A. A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells, *Bioinformatics*, 14: 384-390 (1998); <http://www.hri.co.jp/atgpr/>] と PSORT による解析および GenBank や SwissProt に対する BLAST 解析を行った。PSEC0004 は「全長率の高いオリゴキャップ法で作成したヒト cDNA ライブラリーから、ATGpr 等で全長 cDNA クローンであると判断され、かつ、PSORT で N 末端にシグナル配列が存在する分泌蛋白質、または膜蛋白質と予測されるクローン」である。以上の結果を、次に示す。

クローン名 : PSEC0004

cDNA のサイズ : 1883 : C-NT2RM1000558

推定アミノ酸配列の構成アミノ酸数 : 326

N 末端から数えた ATG の数 : 1

最大 ATGpr1 値 : 0.94

アノテーション : 532/852 (62%) similarity to human death effector domain-containing testicular molecule mRNA

[実施例 2] ホモロジー解析による機能予測

アポトーシスに関わる一部の遺伝子は Death Effector Domain (DED) を共有していることが報告されている (Chinnaiyan AM, et al 1995 Cell 81:505-512. Muzio M et al, 1996 Cell 85:817-827. Fernandes-Alnemri 1996 Proc. Natl Acad Sci USA 93:7464-7469)。たとえば、CD95 (Fas) によるアポトーシスシグナルで重要な役割を担っている FADD や Caspase8 などと同様に、DEDD も DED を含む新規な分子であることが報告されている (Alexander H. Stegh et al. 1998 The EMBO Journal 17, 20, 5974-5986. Peter, M.E. et al, 1995 Cell Death Differ., 2, 163-171)。そこで、DEDD の N 末端側 76 残基 (LYSLHRMFDIVGTHLT HRDVRVLSFLFLVDVIDDHERGLIRNGRDFFLLALERQGRCDENFRQVLQLLRIITRHDLL / 配列番号 : 9 (DEDD : 23-99)) をクエリーとして用い、前記全長 cDNA クローンに対する相同性解析 (Blast2) を行った。その結果、NT2RM1000558 によってコードされるアミノ酸配列が約 43% の相同性を示した。

DEDD と、同様にアポトーシスに関わる一部の遺伝子は、Caspase により切断される特異的な配列 (DEXD) を持つことが報告されている。Caspase は、アポトーシスのエフェクター蛋白と位置付けられる。そこでこの配列 (DEXD) をクエリーとして用い、前記全長 cDNA クローンに対する相同性解析 (Blast2) を行った。その結果、同じく NT2RM1000558 によってコードされるアミノ酸配列の C 末端近傍に DEAD 配列が見出された。

以上の結果から、NT2RM1000558 クローンはアポトーシスに関わる遺伝子であることが予測された。更に、NT2RM1000558 と DEDD の配列を比較したところ、NT2RM1000558 は DEDD で明らかにされている NSL ドメインと高い相同性を示す配列が明らかになり、本遺伝子が、アポトーシスに関わる機能を保持していることが予測された。

〔実施例 4〕 ヒト各組織における発現分布

アポトーシスに関連する機能が推測された NT2RM1000558 の、各組織における発現分布を調べた。Primer1 (TCAGTGTGGATGAGGCTGACT/配列番号: 10 (NT2RM1000558:1013-1033)) および Primer2 (TGCACCTGTGACAGTGCAGA/配列番号: 11 (NT2RM1000558:1399-1380)) を用い Clontech 社 Multiple Tissue cDNA Panels (CODE K1420-1、K1426-1) をテンプレート DNA として、マニュアルに従い PCR 反応 (30cycle) を行った。反応後の混合物をアガロースゲル電気泳動にて泳動し、泳動結果から各組織の NT2RM1000558 の発現量を確認した。

その結果、NT2RM1000558 の発現には、各種組織での特異性は見られず、多くの組織 (脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、胎盤、骨髄、リンパ節、白血球、脾臓、胸腺、扁桃) での発現が確認された。

〔実施例 5〕 NT2RM1000558 の機能解析

以下の発現解析においては、すべての cDNA は pcDNA3.1vector (Invitrogen 社製) を使用した。このベクターは CMV プロモーターの制御下に、哺乳動物細胞で強力に外来遺伝子の発現を誘導する。

pME18SFL3 の制限酵素 Dra III サイトに挿入されている NT2RM1000558 遺伝子を制限酵素の EcoRI と NotI による酵素消化で切り出した。一方、発現ベクターである pcDNA3.1 (Invitrogen) を同じく制限酵素の EcoRI と NotI で酵素消化し、精製した断片をライゲーションさせた。こうして得られた、NT2RM1000558 遺伝子全体を挿入した pcDNA3.1 ベクターを、不活性型発現ベクターとした。

次に、以下のようにして活性型の蛋白質を発現するベクターを構築した。まず、pME18SFL3 の制限酵素 Dra III サイトに挿入されている NT2RM1000558 遺伝子を鋳型として Advantage GC rich PCR kit (Clontech) による PCR を行った。PCR に用いたセンスプライマー 90-GGTTCTGAGCTTGTTC (配列番号: 12) は、NT2RM100

0558 遺伝子の 5'非翻訳領域の塩基配列に相当する塩基配列からなっている。一方アンチセンスプライマーである TCAGTCAGCCTCATCCACACTGA-1013 (配列番号: 13) は、蛋白質のアミノ酸配列 VSVDEAD 部分をコードする塩基配列とその直後に stop コドンに相当する塩基配列を付加した塩基配列からなっている。PCR の後、PCR 産物(活性型)を TA-クローニングベクターである pT7Blue-2T (Novagen 社製)に連結した。pT7Blue-2T に挿入した NT2RM1000558 の活性型遺伝子は、SP6 primer と M13 primer を用いて BigDye terminator Cycle sequence kit (PE Biosystems) と PE310 Genetic Analyzer (PE Biosystems) により、塩基配列を決定して NT2RM1000558 の活性型の配列に PCR による変異がないことを確認した。

さらに、pT7Blue-2T に挿入した NT2RM1000558 の活性型の遺伝子を、pT7Blue-2T に存在する制限酵素サイトの EcoRI と XhoI を利用して、制限酵素の EcoRI と XhoI による酵素消化で切り出した。そして発現ベクターである pcDNA3.1 を同じく制限酵素の EcoRI と XhoI で酵素消化したものと、精製した断片とをライゲーションさせた。こうして得られた、NT2RM1000558 の活性型遺伝子を挿入した pcDNA3.1 ベクターを、活性型発現ベクターとした。

6 wells プレートに、1well あたり 2×10^5 個の HEK 293 T 細胞をまき、一晚培養した。10 μ l の Lipofectamine 2000 溶液 (Gibco BRL) に、250 μ l の Opti-MEM 溶液を加えて攪拌し、5 分間室温で放置した後、4 μ g の plasmid DNA (不活性型発現ベクター、または活性型発現ベクター) を 250 μ l の Opti-MEM 溶液に混合したものを加えて、さらに 20 分間室温で放置した。得られた Lipofectamine 2000-plasmid DNA 混合溶液を、上記培養細胞に添加して 30 時間培養することにより活性型遺伝子、または不活性型遺伝子を導入した。

培養液を除去後、2ml の PBS-EDTA 溶液を加えてピペティングにより細胞をプレートより剥がして懸濁した。そして 400xg で 5 分間遠心し、上清の PBS を取り除いた。更に、細胞に 1ml の PBS を加えて懸濁後、400xg で 5 分間遠心し、上清の PBS を取り除いた。

続いて細胞に 100 μ l の 1% グルタルアルデヒド溶液を加えて懸濁し、室温で 30 分間放置して細胞を固定した。その後、400xg で 5 分間遠心し、上清の固定液を取り除いた。更に、細胞に 1 ml の PBS を加えて懸濁し、400xg で 5 分間遠心し、上清の PBS を取り除いた。

この細胞に 20 μ l の PBS を加えて懸濁し、5 μ l の 1mM ヘキスト 33258 (SIGMA 社) 溶液(蛍光色素)を加えて懸濁した。スライドグラスに該細胞懸濁液を 1 滴落としてカバーグラスを載せて蛍光顕微鏡下で細胞の核の形態(核の断片化)を観察した。

上記の方法にて NT2RM1000558 遺伝子の全長配列を導入した細胞(アミノ酸 326 残基)には、アポトーシスによる核の断片化が見られなかったが、NT2RM1000558 遺伝子の DEAD 部分以降を欠損させた活性化型と思われる NT2RM1000558 Activated form(アミノ酸 303 残基)を導入した細胞はアポトーシスによる核の断片化が見られた。対象として、Caspase3 遺伝子を導入した細胞には、アポトーシスによる核の断片化が見られた。

NT2RM1000558 遺伝子に存在する活性化 Caspase による切断認識配列の DEAD 配列は、Caspase family の切断認識配列の基質特異性から、Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) や DNA fragmentation factor などと同様に、Caspase3、6、7 によって切断され活性化して、アポトーシス実行の最終的な役割を担う分子であることを推測している。

NT2RM1000558 遺伝子から In vitro の transcription/translation system により、蛋白を合成したところ、SDS-PAGE で 36kd のバンドが確認された。そこで、本遺伝子は、予想通りのフレームで開始メチオニンから実際の蛋白質の翻訳がはじまることが確認された。

産業上の利用の可能性

本発明によって、新規なアポトーシス関連因子が提供された。本発明によるアポトーシス関連因子は、アポトーシス実行カスケードの下流を構成するグループ 2 の caspase の認識部位を含んでいる。したがって、本発明のアポトーシス関連因子は、アポトーシスの最終段階に関与する重要な蛋白質である可能性がある。実際、本発明のアポトーシス関連因子の活性型分子を強制発現させた細胞では、典型的なアポトーシスの症状が観察されるようになる。したがって、本発明のアポトーシス関連因子の作用を制御する化合物を、アポトーシスを指標としてスクリーニングすることができる。本発明のスクリーニングによって得ることができる化合物は、細胞増殖や細胞死を制御するための薬剤として有用である。

たとえば本発明のアポトーシス関連因子の作用を抑制する化合物は、アポトーシスの進行を防ぐ薬剤として利用することができる。本発明のアポトーシス関連因子がアポトーシス実行カスケードの最終段階において機能していることから、その作用を妨げる化合物は、アポトーシスを効果的に抑制する。本発明のアポトーシス関連因子はヒト各組織に広く分布しており、アポトーシスにより障害が拡大するような前述の各種病態にとり、本因子は重要な役割を担っていると予測される。特に本発明のアポトーシス関連因子は、神経細胞から単離されたものである。障害の予防薬脳虚血疾患にともなう脳細胞のアポトーシスの制御は、脳組織の障害の予防や治療における重要な課題である。本発明のアポトーシス関連因子は、脳組織の障害の予防や治療の標的分子として、重要である。

また逆に本発明のアポトーシス関連因子の作用を増強したり、あるいは本発明のアポトーシス関連因子の産生を刺激する化合物は、細胞死を促進する薬剤として有用である。本発明のアポトーシス関連因子は、アポトーシスを強力に誘導する。したがって、たとえば、癌のような細胞増殖性疾患において、細胞増殖を抑制するための薬剤として、本発明のアポトーシス関連因子そのものや、その産生を促進する化合物を用いることができる。

- 36 -

アポトーシスは様々な原因によって起きる現象であるが、その実行カスケードの最終段階に作用する薬剤は、アポトーシスの原因に関わらず、その制御を行う。したがって本発明のアポトーシス関連因子の作用を制御することができる化合物は、幅広い疾患に対して、アポトーシスの制御を実現するものと期待できる。

請求の範囲

1. 下記 (a) から (d) のいずれかに記載のアポトーシス誘導活性を持つ蛋白質をコードするポリヌクレオチド。
 - (a) 配列番号：1 に記載された塩基配列を含むポリヌクレオチド、
 - (b) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、
 - (c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、
 - (d) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、
2. 配列番号：1 に記載の塩基配列と 60 % 以上のホモロジーを有する請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。
3. 下記 (e) から (h) のいずれかに記載の、アポトーシス誘導活性を持つ蛋白質の前駆体をコードするポリヌクレオチド。
 - (e) 配列番号：3 に記載の塩基配列の蛋白質コード領域を含むポリヌクレオチド、
 - (f) 配列番号：4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、
 - (g) 配列番号：4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、
 - (h) 配列番号：3 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、
4. 配列番号：3 に記載の塩基配列と 60 % 以上のホモロジーを有する請求項 3 に記載のポリヌクレオチド。

5. 請求項 1 または請求項 3 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド。
6. 配列番号：3 に記載の塩基配列を含む遺伝子と、分子進化上、同一の遺伝子をコードするポリヌクレオチド。
7. 配列番号：4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：4 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質に対してドミナントネガティブの形質を持つタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
8. 配列番号：4 に記載のアミノ酸配列において、300-303 位のアミノ酸配列が caspase 耐性のアミノ酸配列に改変されたアミノ酸配列をコードする請求項 7 に記載のポリヌクレオチド。
9. 請求項 1、請求項 3、請求項 5、請求項 6、および請求項 7 のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質。
10. 請求項 1、請求項 3、請求項 5、請求項 6、および請求項 7 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
11. 請求項 1、請求項 3、請求項 5、請求項 6、および請求項 7 のいずれかに記載のポリヌクレオチド、または請求項 10 に記載のベクターを保持する形質転換体。
12. 請求項 11 に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、請求項 9 に記載のタンパク質の製造方法。
13. 請求項 1、請求項 3、請求項 5、請求項 6、および請求項 7 のいずれかに記載のポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなる少なくとも 15 塩基の長さを有するポリヌクレオチド。
14. 請求項 9 に記載の蛋白質に対する抗体。
15. 請求項 9 に記載の蛋白質と、請求項 14 に記載の抗体の免疫学的な反応を観察する工程を含む、免疫学的測定方法。

16. 次の工程を含む、アポトーシスを制御する物質をスクリーニングする方法。
 - (1) 請求項1または請求項3に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質を発現する細胞に候補物質を接触させる工程、および
 - (2) アポトーシスが誘導される条件下で前記細胞を培養し、アポトーシスを抑制、または促進する候補物質を選択する工程
17. 次の工程を含む、アポトーシスを制御する物質をスクリーニングする方法。
 - (1) 配列番号：3に記載の塩基配列からなる遺伝子の発現制御領域と、その下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、
 - (2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、および
 - (3) 対照と比較して、工程(2)におけるレポーター活性を増加または減少させる候補物質を選択する工程
18. 細胞増殖、または細胞死の制御における請求項16、または請求項17に記載の方法によって得ることができる化合物の使用。
19. 請求項16、または請求項17に記載の方法によって得ることができる化合物を主成分として含有することを特徴とする、細胞増殖、または細胞死に特徴付けられる疾患の治療剤。



SEQUENCE LISTING

<110> Helix Research Institute.

<120> Apoptosis Relating Factor

<130> H1-106PCT1

<140>

<141>

<150> JP 1999-194179

<151> 1999-07-08

<150> US 60/159586

<151> 2000-10-18

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 909

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(909)

<400> 1

atg gcg cta tcc ggg tgc acc ccg gcc ccg tgc tgg gag gag gat gag	48
Met Ala Leu Ser Gly Ser Thr Pro Ala Pro Cys Trp Glu Glu Asp Glu	
1 5 10 15	

tgc ctg gac tac tac ggg atg ctg tgc ctt cac cgt atg ttc gag gtg	96
Cys Leu Asp Tyr Tyr Gly Met Leu Ser Leu His Arg Met Phe Glu Val	
20 25 30	

gtg ggc ggg caa ctg acc gag tgc gag ctg gag ctc ctg gcc ttt ctg	144
Val Gly Gly Gln Leu Thr Glu Cys Glu Leu Glu Leu Leu Ala Phe Leu	
35 40 45	

ctg gat gag gct cct ggc gcc gcc gga ggc tta gcc cgg gcc cgc agc	192
Leu Asp Glu Ala Pro Gly Ala Ala Gly Gly Leu Ala Arg Ala Arg Ser	
50 55 60	

ggc cta gag ctc ctg ctg gag ctg gag cgc cgc ggg cag tgc ggc gag	240
---	-----



Gly 65	Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Leu	Glu	Arg	Arg	Gly	Gln	Cys	Gly	Glu	80	
agg aac ctg cgg ctg ctg ggg caa ctc ctg cgc gtg ctg gcc cgc cac	288																
Ser Asn Leu Arg	85	Leu Leu Gly Gln Leu	90	Leu Arg Val Leu Ala Arg His	95												
gac ctg ctg ccg cac ctg gcg cgc aag cgg cgc cgg cca gtg tct cca	336																
Asp Leu Leu	100	Pro His Leu Ala Arg	105	Lys Arg Arg Arg Pro Val Ser Pro	110												
gaa cgc tat agc tat ggc acc tcc agc tct tca aag agg aca gag ggt	384																
Glu Arg Tyr Ser Tyr Gly Thr	115	120	125														
agc tgc cgt cgc cgt cgg cag tca agc agt tct gca aat tct cag cag	432																
Ser Cys Arg Arg Arg Arg	130	135	140														
ggt cag tgg gag aca ggc tcc ccc cca acc aag cgg cag cgg cgg agt	480																
Gly Gln Trp Glu Thr	145	150	155	160													
cgg ggc cgg ccc agt ggt ggt gcc aga cgg cgg cgg aga ggg gcc cca	528																
Arg Gly Arg Pro	165	170	175														
gcc gca ccc cag cag cag tca gag ccc gcc aga cct tcc tct gaa ggc	576																
Ala Ala Pro	180	185	190														
aaa gtg acc tgt gac atc cgg ctc cgg gtt cga gca gag tac tgc gag	624																
Lys Val Thr Cys Asp Ile Arg	195	200	205														
cat ggg cca gcc ttg gag cag ggc gtg gca tcc cgg cgg ccc cag gcg	672																
His Gly Pro Ala Leu Glu Gln Gly Val Ala Ser	210	215	220														
ctg gcg cgg cag ctg gac gtg ttt ggg cag gcc acc gca gtg ctg cgc	720																
Leu Ala Arg Gln Leu Asp Val Phe Gly Gln Ala Thr	225	230	235	240													
tca agg gac ctg ggc tct gtg gtt tgt gac atc aag ttc tca gag ctc	768																
Ser Arg Asp Leu Gly Ser Val Val Cys Asp Ile Lys Phe Ser	245	250	255														
tcc tat ctg gac gcc ttc tgg ggc gac tac ctg agt ggc gcc ctg ctg	816																

Ser Tyr Leu Asp Ala Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Ser Gly Ala Leu Leu
 260 265 270

cag gcc ctg cgg ggc gtg ttc ctg act gag gcc ctg cga gag gct gtg 864
 Gln Ala Leu Arg Gly Val Phe Leu Thr Glu Ala Leu Arg Glu Ala Val
 275 280 285

ggc cgg gag gct gtt cgc ctg ctg gtc agt gtg gat gag gct gac 909
 Gly Arg Glu Ala Val Arg Leu Leu Val Ser Val Asp Glu Ala Asp
 290 295 300

<210> 2

<211> 303

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Leu Ser Gly Ser Thr Pro Ala Pro Cys Trp Glu Glu Asp Glu
 1 5 10 15

Cys Leu Asp Tyr Tyr Gly Met Leu Ser Leu His Arg Met Phe Glu Val
 20 25 30

Val Gly Gly Gln Leu Thr Glu Cys Glu Leu Glu Leu Leu Ala Phe Leu
 35 40 45

Leu Asp Glu Ala Pro Gly Ala Ala Gly Gly Leu Ala Arg Ala Arg Ser
 50 55 60

Gly Leu Glu Leu Leu Leu Glu Leu Glu Arg Arg Gly Gln Cys Gly Glu
 65 70 75 80

Ser Asn Leu Arg Leu Leu Gly Gln Leu Leu Arg Val Leu Ala Arg His
 85 90 95

Asp Leu Leu Pro His Leu Ala Arg Lys Arg Arg Arg Pro Val Ser Pro
 100 105 110

Glu Arg Tyr Ser Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Ser Lys Arg Thr Glu Gly
 115 120 125

Ser Cys Arg Arg Arg Arg Gln Ser Ser Ser Ser Ala Asn Ser Gln Gln
 130 135 140

Gly Gln Trp Glu Thr Gly Ser Pro Pro Thr Lys Arg Gln Arg Arg Ser
 145 150 155 160

Arg Gly Arg Pro Ser Gly Gly Ala Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro
165 170 175

Ala Ala Pro Gln Gln Gln Ser Glu Pro Ala Arg Pro Ser Ser Glu Gly
180 185 190

Lys Val Thr Cys Asp Ile Arg Leu Arg Val Arg Ala Glu Tyr Cys Glu
195 200 205

His Gly Pro Ala Leu Glu Gln Gly Val Ala Ser Arg Arg Pro Gln Ala
210 215 220

Leu Ala Arg Gln Leu Asp Val Phe Gly Gln Ala Thr Ala Val Leu Arg
225 230 235 240

Ser Arg Asp Leu Gly Ser Val Val Cys Asp Ile Lys Phe Ser Glu Leu
245 250 255

Ser Tyr Leu Asp Ala Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Ser Gly Ala Leu Leu
260 265 270

Gln Ala Leu Arg Gly Val Phe Leu Thr Glu Ala Leu Arg Glu Ala Val
275 280 285

Gly Arg Glu Ala Val Arg Leu Leu Val Ser Val Asp Glu Ala Asp
290 295 300

<210> 3

<211> 1883

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (124)..(1101)

<400> 3

aggcgtaata atagagaagg tgccagaaag atccaaaaca agtggctgcg gccgtcgccc 60

aggagtcatac ggacgccaga atctggccgg gttctgagct tgttccgcct cctcccccg 120

gga atg gcg cta tcc ggg tcg acc ccg gcc ccg tgc tgg gag gag gat 168
Met Ala Leu Ser Gly Ser Thr Pro Ala Pro Cys Trp Glu Glu Asp
1 5 10 15

gag tgc ctg gac tac tac ggg atg ctg tcg ctt cac cgt atg ttc gag 216
Glu Cys Leu Asp Tyr Tyr Gly Met Leu Ser Leu His Arg Met Phe Glu

20										25					30					
gtg	gtg	ggc	ggg	caa	ctg	acc	gag	tgc	gag	ctg	gag	ctc	ctg	gcc	ttt					264
Val	Val	Gly	Gly	Gln	Leu	Thr	Glu	Cys	Glu	Leu	Glu	Leu	Leu	Ala	Phe					
			35					40					45							
ctg	ctg	gat	gag	gct	cct	ggc	gcc	gcc	gga	ggc	tta	gcc	cgg	gcc	cgc					312
Leu	Leu	Asp	Glu	Ala	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	Ala	Arg	Ala	Arg					
		50					55					60								
agc	ggc	cta	gag	ctc	ctg	ctg	gag	ctg	gag	cgc	cgc	ggg	cag	tgc	ggc					360
Ser	Gly	Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Leu	Glu	Arg	Arg	Gly	Gln	Cys	Gly					
	65					70					75									
gag	agc	aac	ctg	cgg	ctg	ctg	ggg	caa	ctc	ctg	cgc	gtg	ctg	gcc	cgc					408
Glu	Ser	Asn	Leu	Arg	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Leu	Arg	Val	Leu	Ala	Arg					
80					85					90					95					
cac	gac	ctg	ctg	ccg	cac	ctg	gcg	cgc	aag	cgg	cgc	cgg	cca	gtg	tct					456
His	Asp	Leu	Leu	Pro	His	Leu	Ala	Arg	Lys	Arg	Arg	Arg	Pro	Val	Ser					
				100					105					110						
cca	gaa	cgc	tat	agc	tat	ggc	acc	tcc	agc	tct	tca	aag	agg	aca	gag					504
Pro	Glu	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Arg	Thr	Glu					
			115					120					125							
ggt	agc	tgc	cgt	cgc	cgt	cgg	cag	tca	agc	agt	tct	gca	aat	tct	cag					552
Gly	Ser	Cys	Arg	Arg	Arg	Arg	Gln	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Asn	Ser	Gln					
		130					135					140								
cag	ggt	cag	tgg	gag	aca	ggc	tcc	ccc	cca	acc	aag	cgg	cag	cgg	cgg					600
Gln	Gly	Gln	Trp	Glu	Thr	Gly	Ser	Pro	Pro	Thr	Lys	Arg	Gln	Arg	Arg					
	145					150					155									
agt	cgg	ggc	cgg	ccc	agt	ggt	ggt	gcc	aga	cgg	cgg	cgg	aga	ggg	gcc					648
Ser	Arg	Gly	Arg	Pro	Ser	Gly	Gly	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Gly	Ala					
160					165					170					175					
cca	gcc	gca	ccc	cag	cag	cag	tca	gag	ccc	gcc	aga	cct	tcc	tct	gaa					696
Pro	Ala	Ala	Pro	Gln	Gln	Gln	Ser	Glu	Pro	Ala	Arg	Pro	Ser	Ser	Glu					
				180					185					190						
ggc	aaa	gtg	acc	tgt	gac	atc	cgg	ctc	cgg	gtt	cga	gca	gag	tac	tgc					744
Gly	Lys	Val	Thr	Cys	Asp	Ile	Arg	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Glu	Tyr	Cys					
			195					200					205							
gag	cat	ggg	cca	gcc	ttg	gag	cag	ggc	gtg	gca	tcc	cgg	cgg	ccc	cag					792
Glu	His	Gly	Pro	Ala	Leu	Glu	Gln	Gly	Val	Ala	Ser	Arg	Arg	Pro	Gln					

210	215	220	
gcg ctg gcg cgg cag ctg gac gtg ttt ggg cag gcc acc gca gtg ctg			840
Ala Leu Ala Arg Gln Leu Asp Val Phe Gly Gln Ala Thr Ala Val Leu			
225	230	235	
cgc tca agg gac ctg ggc tct gtg gtt tgt gac atc aag ttc tca gag			888
Arg Ser Arg Asp Leu Gly Ser Val Val Cys Asp Ile Lys Phe Ser Glu			
240	245	250	255
ctc tcc tat ctg gac gcc ttc tgg ggc gac tac ctg agt ggc gcc ctg			936
Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Ser Gly Ala Leu			
260	265	270	
ctg cag gcc ctg cgg ggc gtg ttc ctg act gag gcc ctg cga gag gct			984
Leu Gln Ala Leu Arg Gly Val Phe Leu Thr Glu Ala Leu Arg Glu Ala			
275	280	285	
gtg ggc cgg gag gct gtt cgc ctg ctg gtc agt gtg gat gag gct gac			1032
Val Gly Arg Glu Ala Val Arg Leu Leu Val Ser Val Asp Glu Ala Asp			
290	295	300	
tat gag gct ggc cgg cgc cgc ctg ttg ctg atg gag gag gaa ggg ggg			1080
Tyr Glu Ala Gly Arg Arg Arg Leu Leu Leu Met Glu Glu Glu Gly Gly			
305	310	315	
cgg cgc ccg aca gag gcc tcc tgatccagga ctggcaggat tgatcccacc			1131
Arg Arg Pro Thr Glu Ala Ser			
320	325		
tccaagtctc cgggccacct tctcctggga ggacgaccat ctctaccct tgacagcccc			1191
tcccacagga tgtgggctct gaggcctaaa ccatttcag ctgagtttcc tcccagact			1251
cctcctaccc ccagggtgtgc ccccttagcc tccggaggcg ggggctgggc ctgtatctca			1311
gaagggaggg gcacagctac acactcacca aaggccccc tgcacattgt atctctgac			1371
ttgggctgtc tgcactgtca cagggtgcaca cactcgctca tgctcacact gcccctgctg			1431
agatcttccc tgggcctctg ccctggcctg cttcccagca cacacttctt tggcctaagg			1491
gcttctctct caggacctct aatttgacca caaccaacct gggcttcagc cacatcagtg			1551
ggcactggag ctggggtgca catggggcct gctcaccttg cccacacatc tccagccagc			1611
cagggccctg cccagcttca atttacagac ctgactctcc tcaccttccc ccctgctgtc			1671



cagagctgaa catagacttg cacttggatg tcacctggag tgtcacatgg gagtggtatg 1731
gcagcatcat accaaggcct actgttgcac atggggccaa aaccagtaaa cagccacctt 1791
cttggaaagg gaatgcaaag gctttggggg tgatggaaaa gaccttttac aaatgatacc 1851
aattaaactg ccctggaaag ggcataggtg gg 1883

<210> 4
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Ala Leu Ser Gly Ser Thr Pro Ala Pro Cys Trp Glu Glu Asp Glu
1 5 10 15
Cys Leu Asp Tyr Tyr Gly Met Leu Ser Leu His Arg Met Phe Glu Val
20 25 30
Val Gly Gly Gln Leu Thr Glu Cys Glu Leu Glu Leu Leu Ala Phe Leu
35 40 45
Leu Asp Glu Ala Pro Gly Ala Ala Gly Gly Leu Ala Arg Ala Arg Ser
50 55 60
Gly Leu Glu Leu Leu Leu Glu Leu Glu Arg Arg Gly Gln Cys Gly Glu
65 70 75 80
Ser Asn Leu Arg Leu Leu Gly Gln Leu Leu Arg Val Leu Ala Arg His
85 90 95
Asp Leu Leu Pro His Leu Ala Arg Lys Arg Arg Arg Pro Val Ser Pro
100 105 110
Glu Arg Tyr Ser Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Ser Lys Arg Thr Glu Gly
115 120 125
Ser Cys Arg Arg Arg Arg Gln Ser Ser Ser Ser Ala Asn Ser Gln Gln
130 135 140
Gly Gln Trp Glu Thr Gly Ser Pro Pro Thr Lys Arg Gln Arg Arg Ser
145 150 155 160
Arg Gly Arg Pro Ser Gly Gly Ala Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro
165 170 175

Ala Ala Pro Gln Gln Gln Ser Glu Pro Ala Arg Pro Ser Ser Glu Gly
 180 185 190
 Lys Val Thr Cys Asp Ile Arg Leu Arg Val Arg Ala Glu Tyr Cys Glu
 195 200 205
 His Gly Pro Ala Leu Glu Gln Gly Val Ala Ser Arg Arg Pro Gln Ala
 210 215 220
 Leu Ala Arg Gln Leu Asp Val Phe Gly Gln Ala Thr Ala Val Leu Arg
 225 230 235 240
 Ser Arg Asp Leu Gly Ser Val Val Cys Asp Ile Lys Phe Ser Glu Leu
 245 250 255
 Ser Tyr Leu Asp Ala Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Ser Gly Ala Leu Leu
 260 265 270
 Gln Ala Leu Arg Gly Val Phe Leu Thr Glu Ala Leu Arg Glu Ala Val
 275 280 285
 Gly Arg Glu Ala Val Arg Leu Leu Val Ser Val Asp Glu Ala Asp Tyr
 290 295 300
 Glu Ala Gly Arg Arg Arg Leu Leu Leu Met Glu Glu Glu Gly Gly Arg
 305 310 315 320
 Arg Pro Thr Glu Ala Ser
 325

<210> 5
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Oligo-cap Linker

<400> 5
 agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg

30

<210> 6
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized oligo dT primer

<400> 6

gcggctgaag acggcctatg tggccttttt tttttttttt tt

42

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

agcatcgagt cggccttggt g

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

gcggctgaag acggcctatg t

21

<210> 9

<211> 77

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Query Sequence
for DED Domain

<400> 9

Leu Tyr Ser Leu His Arg Met Phe Asp Ile Val Gly Thr His Leu Thr
1 5 10 15

His Arg Asp Val Arg Val Leu Ser Phe Leu Phe Leu Val Asp Val Ile
 20 25 30
 Asp Asp His Glu Arg Gly Leu Ile Arg Asn Gly Arg Asp Phe Leu Leu
 35 40 45
 Ala Leu Glu Arg Gln Gly Arg Cys Asp Glu Ser Asn Phe Arg Gln Val
 50 55 60
 Leu Gln Leu Leu Arg Ile Ile Thr Arg His Asp Leu Leu
 65 70 75

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence

<400> 10
 tcagtgtgga tgaggctgac t 21

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence

<400> 11
 tgcacctgtg acagtgcaga 20

<210> 12
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence



<400> 12
ggttctgagc ttgttcc

17

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 13
tcagtcagcc tcatccacac tga

23



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/10, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15,
C12P 21/02, C07K 16/18,
C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/10, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15,
C12P 21/02, C07K 16/18,
C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),
REGISTRY (STN), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 98/52963, A1 (UNIV JEFFERSON THOMAS), 26 November, 1998 (26.11.98) & AU, 9876880, A & EP, 983293, A1 & US, 6037461, A & US, 6063760, A	1-19
P, A	WO, 99/64584, A2 (DEUT KREBSFORSCHUNGSZENTRUM), 09 December, 1999 (09.12.99) & DE, 19825621, A1 & AU, 9952781, A	1-19
A	STEGH, A. H. et al., "DEDD, a novel death effector domain- containing protein, targeted to the nucleolus", EMBO J. (1998) Vol.17, No.20, p.5974-5986	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 September, 2000 (27.09.00)

Date of mailing of the international search report
10 October, 2000 (10.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/10, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15, C12P 21/02, C07K 16/18, C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/10, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15, C12P 21/02, C07K 16/18, C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), REGISTRY (STN), CA (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 98/52963, A1 (UNIV JEFFERSON THOMAS) 26. 11月. 1998 (26. 11. 98) & AU, 9876880, A & EP, 983293, A1 & US, 6037461, A & US, 6063760, A	1-19
P, A	WO, 99/64584, A2 (DEUT KREBSFORSCHUNGSZENTRUM) 09. 12月. 1999 (09. 12. 99) & DE, 19825621, A1 & AU, 9952781, A	1-19
A	STEGH, A. H. et al. "DEDD, a novel death effector domain- containing protein, targeted to the nucleolus", EMBO J. (1998) Vol. 17, No. 20, p. 5974-5986	1-19
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	27. 09. 00	国際調査報告の発送日 10.10.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9281

5
1
3

1
2
3